

## Research Report

### Uji toksisitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa pada kultur sel dengan *MTT* assay

(The toxicity test of *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa monoclonal antibodies in cell culture with *MTT* assay)

Rini Devijanti Ridwan

Staf Pengajar Departemen Biologi Oral  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga  
Surabaya – Indonesia

#### ABSTRACT

Dental caries is infectious disease in hard tissue of tooth which cause dental structural disorder and chronic. From several the result of the study in Jakarta and Surabaya showed that the prevalency of dental caries was high. Therefore prevention of dental caries is still continuing, because the prevalency caries is high. There were many method to prevent dental caries, i.e. dental education, oral hygiene, special method on tooth brushing, water fluoridation, fissure sealant and later on the passive immunization with monoclonal antibodies. The material qualifications in dentistry must be non toxic, non irritation in tissue and have biocompatibility. The purpose of this study was to investigate about monoclonal antibodies toxicity of IgA, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub> in BHK-21 cell culture with *MTT* assay. A laboratory experimental study has been carried out. BHK-21 cell was included in microplate well with density  $2 \times 10^5$  in 100  $\mu$ l culture media, included for every well with IgA, IgG<sub>1</sub> or IgG<sub>3</sub> about 50  $\mu$ l, appropriate with sample group. The cell control and media control were prepared too. Cell control was cell and culture media. Media control was only culture media. Replication for each monoclonal antibodies (with IgA, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub>) was 10 times. Microplate with PBS (25  $\mu$ l) and *MTT* 5 mg/ml was incubated for 24 hours in 37°C. Optical density formazan read by spectrophotometer with  $\lambda$  540 nm. The data obtained in this study was analyzed with one way Anova and LSD. The result of this study showed that there was a significant difference of toxicity between IgA and IgG<sub>3</sub> so IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub>. There wasn't a significant difference of toxicity between IgA and IgG<sub>1</sub> so between IgA with control group, but there was a significant difference of toxicity between IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub> with control group. The conclusion of this study showed that monoclonal antibodies of *S. mutans* 1 (c) 67 kDa wasn't toxic and the material was safe to use with the lowest percentage level of the dead cell were IgA, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub>.

**Key words:** monoclonal antibody, toxicity, *MTT* assay.

Korespondensi (correspondence) : Rini Devijanti R., Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjen. Pof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia.

#### PENDAHULUAN

Karies gigi merupakan penyakit infeksi pada jaringan karies gigi yang bersifat lokal, progresif, menyebabkan kehancuran struktur gigi dan bersifat kronis.<sup>1</sup> Etiologi karies gigi bersifat multifaktorial, karena banyak hal yang saling berkaitan meliputi inang, diet dan bakteri.<sup>2</sup> Dari faktor bakteri telah dilaporkan bahwa *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) merupakan bakteri penyebab utama karies gigi. *S. mutans* dianggap sebagai bakteri patogen mulut yang paling penting yang terlibat pada proses karies.<sup>3</sup> Karies gigi terjadi karena interaksi antara gigi, bakteri dan gula. Selain tiga faktor tersebut sebenarnya terdapat satu faktor penghambat karies dalam saliva, yaitu antibodi.<sup>4</sup>

Hasil penelitian di Jakarta menunjukkan bahwa 85,17% anak prasekolah menderita karies, sedangkan di Surabaya didapatkan bahwa 92,1% anak Taman Kanak-kanak di Surabaya menderita karies.<sup>5</sup> Keadaan ini menunjukkan bahwa prevalensi karies masih tinggi, oleh karena itu maka

langkah pencegahan masih terus harus dilakukan dan dikembangkan.

Beberapa penelitian ke arah tindakan imunisasi pasif dilakukan untuk pencegahan karies yang meliputi penggunaan antibodi monoklonal secara topikal, pemberian kekebalan pada susu sapi dan minuman semacam yoghurt, pemberian kuning telur yang mengandung antibodi dan antibodi dari tanaman.<sup>6</sup>

Preparat antibodi monoklonal IgG dapat mencegah atau dengan nyata mengurangi kolonisasi *S. mutans*, mengurangi karies gigi dan tidak membutuhkan imunisasi aktif dengan antigen yang bersifat reaktif pada jaringan.<sup>7</sup>

Telah dilakukan penelitian tentang pencegahan terhadap kolonisasi bakteri *S. mutans* dengan aplikasi topikal dari antibodi monoklonal pada manusia. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa dengan pemberian antibodi monoklonal kelas IgG terhadap antigen permukaan sel (SA I/II) dari *S. mutans* sebanyak 10  $\mu$ l yang diaplikasikan pada permukaan bukal, lingual dan fisura gigi,

mampu menyebabkan penurunan kolonisasi bakteri *S. mutans* dari permukaan gigi.<sup>8</sup>

Imunisasi pasif secara lokal dengan antibodi monoklonal merupakan antikaries yang efektif dan imunisasi dengan antibodi monoklonal ini akan mengeliminasi *S. mutans* dalam waktu yang lama di dalam mulut. Imunisasi pasif secara lokal dengan antibodi monoklonal merupakan metoda yang aman untuk pencegahan kolonisasi *S. mutans* di dalam mulut.

Telah diproduksi antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa di Pusvetma Surabaya.<sup>9</sup> Dari hasil pembuatan antibodi monoklonal *S. mutans* tersebut telah dilakukan formulasi dengan pasta gigi dengan dan tanpa deterjen dan didapatkan hasil formulasi tersebut dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans* dan menurunkan jumlah koloni *S. mutans* secara in vitro.<sup>10</sup>

Salah satu syarat bahan yang digunakan dalam bidang kedokteran gigi seharusnya tidak toksik, tidak mengiritasi dan harus mempunyai sifat biokompatibilitas. Hal ini sesuai dengan pendapat<sup>11</sup> yang menyatakan bahwa bahan yang diproduksi tidak boleh mempunyai efek yang merugikan terhadap lingkungan biologis, baik lokal maupun sistemik.

Dengan telah diproduksi antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa yang ditujukan untuk imunisasi pasif secara lokal di dalam rongga mulut khususnya pada gigi penderita untuk mengeliminasi kolonisasi *S. mutans* di dalam rongga mulut, maka perlu dilakukan uji toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* tersebut, sehingga pemakaian antibodi monoklonal *S. mutans* tersebut di dalam rongga mulut sebagai imunisasi pasif secara lokal (topikal) nantinya dapat benar-benar dapat dipertanggungjawabkan tidak akan mengiritasi dan toksis terhadap jaringan, khususnya jaringan di dalam rongga mulut.

Dari latar belakang masalah tersebut di atas, dapat dirumuskan apakah antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa mempunyai sifat toksik terhadap sel fibroblas?

## BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post test only control group*. Bahan yang digunakan adalah antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa, alkohol 70%, kultur *cell line* BHK-21, media kultur berisi *Rosewell Park Memoria Institute-1640* (RPMI-1640) 89%, *Penstrep* 1%, *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10%, *Fungizone* 100 unit/ml, pereaksi *MTT*, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS). Penelitian ini dilakukan Laboratorium Imunokimia Bioteknologi PAU Universitas Gajah Mada Jogjakarta dan Pusvetma Surabaya.

Cara kerja penelitian ini adalah : kultur sel induk (*seed cells*) yang sebelumnya telah

dibekukan dicairkan di dalam akuades steril suhu 37°C. Setelah cair, kultur sel induk diputar dengan *centrifuge* 500 rpm selama 5 menit. Di dalam *laminar flow*, supernatan yang ada dibuang sehingga tersisa endapan sel di dasar. Endapan sel tersebut diambil dan disuspensikan dengan media *Eagle's MEM* yang mengandung *fetal bovine serum* 10% yang kemudian ditanam dalam botol Roux. Untuk mempertahankan pH media dan kultur agar tetap 7,2 dapat diberikan larutan *hepes*. Bila semua telah sesuai dengan prosedur, kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kelembaban CO<sub>2</sub> 5%.

Bila kultur sel di dalam Roux telah penuh, kultur tersebut dibagi (*split*) ke dalam *TC plate* 24 *well* yang ada. Media disesuaikan sehingga terdapat 2 ml media di setiap *well* dan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dengan kelembaban CO<sub>2</sub> 5%. Setelah 24 jam, sel yang terdapat di setiap *well* telah penuh dan siap untuk dilakukan perlakuan.

Sebelum dilakukan uji sitotoksitas, dipersiapkan kultur sel BHK-21 sesuai dengan petunjuk pada laboratorium Biotek-PAU, *microplate* dengan 96 *well* (sumuran). Uji sitotoksitas adalah sebagai berikut, sumuran pada *microplate*, diisi sel dengan kepadatan 2×10<sup>5</sup> dalam 100 µl media kultur, kemudian antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> ditambahkan ke dalam tiap sumuran sebanyak 50 µl, sesuai dengan kelompok sampel. Disiapkan pula kontrol sel dan kontrol media. Kontrol sel adalah setiap sumuran berisi sel dan media kultur saja. Kontrol media adalah setiap sumuran yang berisi media kultur saja. Masing-masing dilakukan 6 kali pengulangan. *Microplate* diinkubasi 20 jam pada suhu 37°C. *Microplate* dikeluarkan dari alat inkubasi, ditambahkan pereaksi *MTT* 5 mg/ml dalam PBS sebanyak 25 µl untuk setiap sumuran, kemudian diinkubasi kembali selama 4 jam. Total waktu inkubasi dalam inkubator 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai tambahkan larutan SDS 10% (*Sodium dodecyl sulphate*) sebanyak 80 µl tiap sumuran. Diputar 3 rpm selama 5 menit. Nilai densitas optik *formazan* dihitung dengan spektrofotometer panjang gelombang 540 nm.<sup>12</sup> Untuk mengetahui prosentase jumlah sel hidup dilakukan dengan memakai rumus<sup>13</sup> :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{perlakuan} + \text{media}}{\text{sel} + \text{media}} \times 100\%$$

Data yang didapat dianalisa menggunakan *Anova* satu arah dengan taraf kemaknaan 5%, bila ada perbedaan dilanjutkan dengan uji LSD.

## HASIL

Hasil rerata dan standart deviasi toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil rerata, standart deviasi dan prosentase sel hidup uji toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> terhadap sel fibroblas BHK-21 (OD).

Kelompok Perlakuan	N	$\bar{X}$	SD	% sel hidup
IgA	10	0,2433	0,0167	99,27%
IgG <sub>1</sub>	10	0,2324	0,0082	95,61%
IgG <sub>3</sub>	10	0,2166	0,0033	90,65%
Kontrol sel	10	0,2446	0,0068	100%
Kontrol media	10	0,0722	0,0018	0%

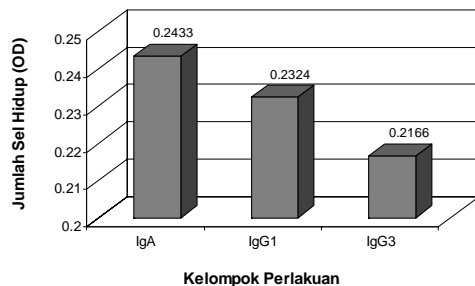
Keterangan :

N = Jumlah sampel

$\bar{X}$  = Rerata jumlah sel hidup

SD = Standart deviasi

Pada Tabel 1 terlihat bahwa antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA mempunyai rerata optikal densitas paling tinggi dibandingkan dengan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> yaitu sebesar 0,2433. Hasil ini menunjukkan bahwa antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA mencapai jumlah sel hidup yang paling tinggi dibandingkan dengan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>, karena semakin tinggi optikal densitasnya maka makin banyak sel yang hidup, hal ini dapat terlihat pada gambar 1.



**Gambar 1.** Grafik rerata sel hidup uji toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> terhadap sel fibroblas BHK-21.

Karena data yang diperoleh homogen dan berdistribusi normal yang diuji dengan *One Sample Kolmogorov Smirnov Test*, maka untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dari toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> terhadap sel fibroblas BHK-21 dilakukan perhitungan statistik dengan menggunakan *Anova* satu arah dengan  $\alpha = 0,05$ , yang tampak pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil *Anova* satu arah toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> terhadap sel fibroblas BHK-21.

Sumber Keragaman	Jk	db	Jkt	F hitung	p
Antar perlakuan	3360	2	1680	14,129	0,000
Dalam perlakuan	3211	27	11890		
Jumlah	6571	29			

Keterangan :

Jk = Jumlah kuadrat

db = Derajat bebas

Jkt = Jumlah kuadrat total

p = Probabilitas

Hasil analisis *Anova* satu arah diperoleh terdapat perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan dengan  $p < 0,05$ , hasil analisis ini menunjukkan bahwa toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> pada sel fibroblas BHK-21 terdapat perbedaan bermakna..

Untuk menentukan antibodi monoklonal mana yang memberikan perbedaan bermakna dilakukan uji LSD dan hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil uji LSD toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> terhadap sel fibroblas BHK-21 ( $p = 0,05$ ).

Kelompok	Kontrol Positif	IgA	IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>3</sub>
Kontrol	-	0,052	0,000*	0,000*
positif	0,052	-	0,052	0,000*
IgA	0,000	0,052	-	0,003*
IgG <sub>1</sub>	0,000	0,000*	0,003*	-
IgG <sub>3</sub>				

\* : Bermakna

Hasil uji LSD tersebut menunjukkan bahwa: tidak terdapat perbedaan bermakna dari antibodi monoklonal IgA dengan kelompok kontrol, tetapi terdapat perbedaan bermakna dari antibodi monoklonal IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> dengan kelompok kontrol; terdapat perbedaan toksisitas yang bermakna dari antibodi monoklonal IgA dengan IgG<sub>3</sub> dan IgG<sub>1</sub> dengan IgG<sub>3</sub>; dan tidak terdapat perbedaan toksisitas yang bermakna dari antibodi monoklonal IgA dan IgG<sub>1</sub>.

## PEMBAHASAN

Pada penelitian toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> diperoleh hasil bahwa pada IgA mempunyai nilai optikal densitas paling tinggi dibandingkan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>, hal ini menunjukkan bahwa IgA mempunyai sifat toksik yang paling rendah dibandingkan IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> walaupun tidak terdapat perbedaan toksisitas yang bermakna dari antibodi monoklonal IgA dan IgG<sub>1</sub>. Hal ini disebabkan karena IgA yang terdiri dari 2 subkelas, yaitu IgA<sub>1</sub> (93%) dan IgA<sub>2</sub> (7%) serta IgG yang

terdiri atas 4 subkelas yaitu IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> dan IgG<sub>4</sub> mempunyai sifat dan aktivitas biologik yang berbeda.<sup>14</sup>

Idealnya semua bahan yang digunakan dalam tubuh harus bersifat biokompatibel, tidak toksik, tidak iritan, tidak karsinogenik dan tidak menimbulkan reaksi alergi.<sup>15</sup> Uji toksisitas merupakan bagian evaluasi biologi untuk mengetahui efek suatu bahan kedokteran gigi yang diperlukan secara langsung terhadap jaringan dalam kultur sel untuk prosedur skrining standar yang direkomendasikan. Metode kultur sel sering digunakan untuk mengetahui efek biologis dari bahan kedokteran gigi yang perhatian terutamanya pada sifat iritasi lokal. Berbagai macam metode digunakan untuk pengamatan toksisitas,<sup>16,17</sup> misalnya *dye exclusion test* menggunakan tripan biru atau eosin, perhitungan sel hidup, pengukuran derajat proliferasi sel, total protein sel, seluler DNA, penentuan aktivitas enzim, pelepasan kromium, pelepasan H<sub>3</sub>-thymidine, teknik histokimia, morfologi sel, dan analisis histologi. Akhir-akhir ini para peneliti telah banyak menggunakan uji enzimatik untuk menentukan toksisitas suatu bahan dengan esei MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). MTT esei mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel yang dapat mereduksi garam *tetrazolium bromide* berwarna kuning menjadi satu endapan *formazan* berwarna biru-ungu yang tidak larut. Produk endapan *formazan* tersebut dilarutkan dengan pelarut agar dapat terdeteksi. Dengan demikian jumlah sel hidup yang terdeteksi dengan spektrofotometer sebagai kadar hasil produk MTT.<sup>18</sup> Semakin pekat warna biru ungunya, semakin tinggi nilai absorbensinya, dan semakin banyak jumlah sel yang hidup.<sup>19</sup> Esei ini banyak digunakan untuk mengukur proliferasi seluler secara kuantitatif atau untuk mengukur jumlah sel yang hidup. Keuntungan esei ini adalah pengukurannya akurat dan sensitif karena menggunakan alat spektrofotometer yang dapat mendeteksi perubahan metabolisme sel secara jelas, mudah manipulasinya, peralatan yang digunakan biasa tersedia di laboratorium, menghemat waktu, tenaga, tidak menggunakan isotop radioaktif.<sup>20</sup> Berdasarkan alasan tersebut maka dalam penelitian ini untuk pengujian toksisitas bahan kedokteran gigi digunakan MTT esei menggunakan kultur sel *cell-line* jenis fibroblas dari *Baby Hamster Kidney* (BHK-21) dengan pertimbangan jenis sel ini berasal dari sel embrio sehingga mudah tumbuh dan mudah dilakukan sub kultur ulang.<sup>21</sup>

Pada penelitian toksisitas ini menunjukkan bahwa antibodi monoklonal IgA menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa pada antibodi monoklonal IgA tidak mempunyai perbedaan jumlah sel hidup dengan kelompok

kontrol atau tidak terdapat perbedaan toksisitas, hal ini disebabkan karena antibodi merupakan molekul protein yang diproduksi oleh makhluk hidup sebagai suatu respons terhadap antigen yang berhasil lolos dari mekanisme pertahanan alami dan masuk ke dalam tubuh. Molekul ini diproduksi oleh sel plasma, yaitu populasi sel yang merupakan diferensiasi akhir dari sel limfosit B, berfungsi sebagai pabrik penghasil antibodi yang spesifik terhadap molekul asing. IgA merupakan imunoglobulin yang paling menonjol dalam sekret dalam bentuk dimer. Dalam serum IgA berbentuk monomer dengan konsentrasi sekitar 15% dari seluruh imunoglobulin.<sup>22</sup>

IgA tidak terikat komplemen dan tidak berfungsi sebagai opsonin. IgA merupakan garis pertama pertahanan tubuh terhadap organisme mikro yang menyerang melalui mukosa. IgA dalam cairan sekresi mencegah organisme mikro berpenetrasi pada sel epitel.<sup>2</sup> Dari hasil penelitian toksisitas ini, sel hidup pada uji toksisitas dengan IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> adalah sebesar 99,27%; 95,61%; dan 90,65%. Keadaan ini menunjukkan bahwa prosentase sel hidup terbesar adalah pada uji toksisitas dengan IgA, kemudian IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>. Jumlah ini dapat dinyatakan tidak toksik, karena parameter toksisitas berdasarkan CD<sub>50</sub>, artinya suatu bahan dikatakan toksik apabila prosentase sel hidup setelah terpapar bahan tersebut kurang dari 50%.<sup>23</sup>

Dari penelitian ini dapat disimpulkan antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa tidak bersifat toksik dan aman digunakan dengan urutan prosentase kematian sel dari yang paling rendah adalah IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada hewan coba untuk memastikan bahwa tidak terdapat toksisitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa karena nantinya dipakai sebagai usaha prevensi untuk kedokteran gigi.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Rosen S, Willet HPO, White RR. Dental caries in essential dental microbiology. Appleton and Lange: A Publishing Division of Prentice Hall. 1991. p. 341-55.
2. Slot J, Taubman MA. Contemporary oral microbiology and immunology. Mosby Year Book; 1992. p. 366-9, 377-414, 524-69.
3. Amerongen AV, Michels LFE, Roukema PA dan Verman ECL. Ludah dan kelenjar ludah arti bagi kesehatan gigi. Penerjemah Arbyono R dan Suryo S. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 1991.p. 23-94.
4. Lehner T. Immunology of dental caries. In: Lehner T. Immunology of oral disease. 3<sup>rd</sup> Ed. London: Blackwell Scientific Publications; 1993. p. 68-79.
5. Nuraini P. Prevalensi karies gigi anak usia 4-6 tahun di Kotamadya Surabaya. Surabaya:

- Lembaga Penelitian Universitas Airlangga; 1993.p.15.
6. Cirino SM, Scantlebury S. Dental caries in developing countries. Preventive and restorative approaches to treatment. pediatric dentistry. NYSDJ 1998; 32-8.
  7. Lehner T. Immunology of oral disease. Immunologi pada penyakit mulut. Diterjemahkan oleh: Farida R dan Suryadhana HG. EGC; 1992.p. 8-25, 61-8.
  8. Ma JKC, Lehner T. Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects. Arschs Oral Biol. 1990; 35 : 1155-225.
  9. Soerodjo TS. Pembuatan dan pemurnian antibodi monoklonal terhadap protein 67 kDa *Streptococcus mutans* 1 (c). (Dalam Penulisan). 2001.
  10. Devijanti R. Antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) 67 kDa dalam pasta gigi untuk menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Tesis. 2003.
  11. Van Noort R. Introduction to dental material. 2<sup>nd</sup> ed. London: CV. Mosby Companyl 2006.p. 3-5.
  12. Kasugai S, Hasegawa N dan Ogura A. Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effect of phenolic compound on established rat pulp cell. J. Dent. Rest. 1991; 70: 127-30.
  13. Titien HA. Pengaruh tegangan listrik dan lama penyinaran pada semen ionomer gelas modifikasi resin terhadap kekerasan permukaan dan sitotoksitas. Thesis. Surabaya: Pascasarjana Universitas Airlangga; 2002.
  14. Baratawidjaja KG. Immunologi dasar. Edisi IV. Cetakan I. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2000.p. 23-94.
  15. Anussavice KJ. Phillips science of dental materials. 11<sup>st</sup> ed. Elsevier Science (USA) Saundersm; 2003.p. 172-94.
  16. Rae T. A review of tissue culture techniques suitable for testing the biocompatibility of implant material evaluation of biomaterial. John Willey & Sons Ltd; 1980.p. 289-93.
  17. Schamalz G. The biocompatibility of non amalgam dental filling materials. Eur J. Oral Sci. 1998; 106, 696-706.
  18. Fernandez BR, Vetviaekav. Method in cellular immunology. Bocaraton, New York, London, Tokyo: CRC Press; 1995. p. 47-52.
  19. Siregar F, Hadijono BS. Uji sitotoksitas dengan esei MTT. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia (Edisi Khusus). 2000; 28-32.
  20. Dash P. Standard protocols MTT assay. Available from : <http://webb.bham.ac.uk/can 4 psd4/brum/mtt.html>. Accessed: 8/1/2002. 2002.
  21. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Alan R Liss Inc; 1987. p. 9, 71, 126, 239.
  22. Subowo. Struktur dan fungsi imunoglobulin, In. Immunologi. 1<sup>st</sup> ed. Bandung: Penerbit Angkasa; 1993.p. 75-88.
  23. Telli C, Serper A, Dogan AL, Guc D. Evaluation of the cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers by MTT assay. J. Endodon. 1999; 25: 811-3.